

Eksplorasi dan Konservasi Sumber Daya Genetik Mikroba Penghasil Bakteriosin Penghambat Pertumbuhan Bakteri Patogen pada Ternak

Chotiah S

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE. Martadinata 30 Bogor, 16114
E-mail: sitichoti@yahoo.co.id

(Diterima 5 Maret 2013; diterima 3 Mei 2013)

ABSTRACT

Chotiah S. 2013. Exploration and conservation of bacterial genetic resources as bacteriocin producing inhibitory microorganisms to pathogen bacteria in livestock. *JITV* 18(2): 114-122

Exploration and conservation of microorganisms producing bacteriocin was done as the primary study towards the collection of potential bacteria and its application in improving livestock health condition and inhibit food borne pathogens. Different kinds of samples such as beef cattle rectal swab, rumen fluids, cow's milk, chicken gut content, goat's milk were collected at Bogor cattle slaughter houses, poultry slaughter houses, dairy cattle and goat farms. A total of 452 bacterial isolates consisted of 73 Gram negative bacteria and 379 Gram positive bacteria were isolated from samples collected and screened for bacteriocin activity. Determination of bacteriocin activity with bioassay using agar spot tests were carried out on liquid and semisolid medium assessing 8 kinds of indicators of pathogenic bacteria and food borne pathogens. A total of 51 bacteriocin producing strains were collected and some of the strains had high inhibitory zone such as *Lactobacillus casei* SS14C (26 mm), *Enterobacter cloacae* SRUT (24mm), *Enterococcus faecalis* SK39 (21mm) and *Bifidobacterium dentium* SS14T (20mm) respectively, to *Salmonella typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311, *E. coli* O157 hemolytic BCC B2717, *Listeria monocytogenes* BCC B2767/ATCC 7764 and *Escherichia coli* VTEC O157 BCC B2687. Evaluation after conservation ex situ to all bacteriocin producing strain at 5°C for 1 year in freeze drying ampoules in vacuum and dry condition revealed the decreasing viability starting from log 0.8 CFU/ml for *Lactococcus* and *Leuconostoc* to log 2.2. CFU/ml for *Streptococcus*. Result of the study showed that the bacteriocin producing strains obtained were offered a potential resource for preventing disease of livestock and food borne diseases.

Key Words: Bacterocin, Bacteria, Exploration, Conservation Ex Situ

ABSTRAK

Chotiah S. 2013. Eksplorasi dan konservasi sumber daya genetik mikroba penghasil bakteriosin penghambat bakteri patogen pada ternak. *JITV* 18(2): 114-122

Eksplorasi dan konservasi sumber daya genetik mikroba penghasil bakteriosin penghambat pertumbuhan bakteri patogen pada ternak telah dilakukan sebagai langkah awal menuju pemanfaatan bakteri potensial dalam meningkatkan kesehatan ternak dan menghambat *foodborne pathogens*. Berbagai sampel yang terdiri dari swab rektal, cairan rumen, susu sapi, isi usus ayam dan susu kambing telah diambil di peternakan sapi potong, sapi perah, kambing perah, rumah potong sapi dan rumah potong ayam. Sebanyak 452 isolat bakteri yang terdiri dari 73 isolat bakteri Gram negatif dan 379 isolat bakteri Gram positif telah diisolasi dari sampel tersebut dan dilakukan penapisan terhadap aktifitas bakteriosin. Metode *agar spot tests* telah digunakan dalam menentukan aktifitas bakteriosin dalam medium semisolid dan cair dengan menggunakan 8 macam indikator bakteri patogen dan pembusuk pangan. Hasil penapisan diperoleh 51 isolat bakteri penghasil bakteriosin, dan diantaranya memiliki zona hambat tinggi adalah *Lactobacillus casei* SS14C (26 mm), *Enterobacter cloacae* SRUT (24 mm), *Enterococcus faecalis* SK39 (21 mm), dan *Bifidobacterium dentium* SS14T (20 mm) masing-masing berurutan terhadap *S. typhimurium* BCC B0046 /ATCC 13311, *E. coli* O₁₅₇ hemolitik BCC B2717, *Listeria monocytogenes* BCC B2767/ATCC 7764, dan *E. coli* VTEC O₁₅₇ BCC B2687. Konservasi eks situ dilakukan terhadap semua isolat tersebut pada suhu 5°C selama 1 tahun dalam ampul *freeze-drying* kondisi kering hampa udara menunjukkan penurunan viabilitas mulai dari log 0,8 CFU/ml (*Lactococcus* dan *Leuconostoc*) sampai dengan log 2.2 CFU/ml (*Streptococcus*). Hasil studi ini memperlihatkan bahwa bakteri penghasil bakteriosin yang diperoleh merupakan sumber daya potensial untuk pencegahan penyakit ternak dan *foodborne disease*.

Kata Kunci: Bakteriosin, Bakteri, Eksplorasi, Konservasi eks situ.

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol dapat menyebabkan munculnya resistensi bakteri tertentu

pada ternak dan residu yang tersisa pada produk peternakan yang dapat mengancam kesehatan masyarakat. Spektrum kerja antibiotik yang luas dapat membunuh semua jenis bakteri yang ada dalam saluran

pencernaan termasuk bakteri yang menguntungkan bagi ternak itu sendiri. Hal ini menekankan pentingnya penurunan penggunaan antibiotik dalam usaha peningkatan produksi ternak.

Pengurangan penggunaan antibiotik pada ternak hanya dapat dicapai jika strategi antimikroba alternatif telah tersedia. Bakteriosin merupakan salah satu subjek perhatian yang berpotensi sebagai alternatif pengganti antibiotik baik pada ternak maupun manusia dalam rangka pengawetan bahan pangan atau pakan dan membunuh bakteri patogen pada saluran pencernaan (Cheigh dan Pyun 2005; Gillor et al. 2004). Menurut Schamberger et al. (2004) bakteriosin memiliki peran yang penting sebagai strategi keamanan pangan pra-panen karena mampu mengendalikan pertumbuhan bakteri patogen dalam usus yang mengganggu kesehatan ternak (*host*) dan potensial untuk mencemari bahan pangan asal ternak (Callaway et al. 2004; Gillor et al. 2004; Timmerman et al. 2004) terutama yang dapat ditularkan ke konsumen hilir (Revolledo et al. 2006; Braden 2006; Hussein 2007).

Bakteriosin merupakan protein yang disintesis secara ribosomal dan bersifat bakterisidal dan bakteristatik terhadap bakteri lain yang mempunyai hubungan dekat dengan bakteri penghasilnya (Ko dan Ahn 2000). Hampir 100 tahun yang lalu bakteriosin pertama kali diidentifikasi sebagai produk dari biakan bakteri *Escherichia coli* yang bersifat tidak tahan panas dan toksik terhadap *E. coli* lain. Sejak itu, bakteriosin telah ditemukan di seluruh garis keturunan utama dari bakteri dan baru-baru ini, telah digambarkan sebagai universal yang diproduksi oleh beberapa anggota *Archaea* (Shand dan Leyva 2008).

Sebagai daerah tropis dan lembab Indonesia memiliki diversitas hayati termasuk diantaranya diversitas mikroorganisme yang tinggi. Secara alami banyak dijumpai mikroorganisme dalam hal ini bakteri yang berpotensi memproduksi bakteriosin di berbagai host dan habitatnya. Oleh karena itu, kegiatan eksplorasi, karakterisasi dan konservasi isolat lokal (indigenous) bakteri penghasil bakteriosin (BPB) yang mempunyai nilai ekonomi tinggi perlu dilakukan. Isolat harus dilestarikan supaya karakternya baik fenotipik maupun genomik tetap stabil, tidak berubah sehingga dapat dimanfaatkan untuk mensejahterakan peternak secara berkelanjutan. Studi ini merupakan langkah terobosan awal menuju pemanfaatan sumberdaya genetik mikroba yang berpotensi memproduksi bakteriosin sehingga dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kesehatan ternak dan keamanan pangan pra panen.

MATERI DAN METODE

Eksplorasi bakteri

Eksplorasi dilakukan di peternakan sapi potong, sapi perah, kambing perah, rumah pemotongan sapi (RPH)

dan rumah pemotongan unggas (RPU) di beberapa Kabupaten di Jawa Barat. Sampel yang diambil berupa swab rektal sapi potong, susu sapi dari penampungan maupun dari ambung langsung, air susu kambing langsung dari ambung, cairan rumen sapi di RPH dan isi usus ayam di RPU. Sampel dikumpulkan, diusahakan secara aseptik dan disimpan didalam boks pendingin dibawa ke laboratorium Bbalitvet. Masing-masing sampel ditumbuhkan dalam medium penumbuh bakteri Gram negatif dan Gram positif masing-masing *ChromoTM ID Coli* agar (BIOMERIEUX, Perancis) dan MRS agar (OXOID, Inggris). Selanjutnya diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C kondisi aerob dan anaerob. Koloni bakteri yang tumbuh dimurnikan dan disimpan dalam medium semi solid untuk dikerjakan lebih lanjut.

Isolat bakteri patogen dan pembusuk pangan sebagai indikator

Sebanyak 8 macam bakteri patogen dan pembusuk pangan yang dapat mencemari makanan atau bahan pangan asal ternak telah digunakan dalam studi ini sebagai bakteri indikator. Bakteri tersebut terdiri dari *S. typhimurium* BCC B 0046/ ATCC 13311, isolat lokal *S. enteritidis* BCC B 2459, isolat lokal *E. coli* O₁₅₇ hemolitik BCC B 2717, isolat lokal *E. coli* verotoksigenik (VTEC) O₁₅₇ BCC B 2687, isolat lokal *E. coli* enterotoksigenik (ETEC) K₉₉ produksi toksin tahan panas BCC B 2422, *Bacillus cereus* produksi spora BCC B 2118/ IMVS 2675, *Staphylococcus aureus* BCC B2062 /ATCC 10832 dan *Listeria monocytogenes* BCC B2767/ATCC 7764 yang diperoleh dari Bbalitvet Culture Collection (BCC).

Aktifitas antibakteri terhadap indikator bakteri patogen dan pembusuk

Pengujian aktifitas antibakteri dikelompokkan menjadi dua kelompok yaitu kelompok bakteri Gram negatif dan kelompok bakteri Gram positif menggunakan metode *agar spot tests* masing-masing mengacu pada Kumar et al. (2009) dan Herreros et al. (2005) dan dimodifikasi.

Setiap isolat bakteri Gram negatif yang akan diuji ditumbuhkan dahulu di dalam medium cair Luria Bertani Miller (LBM) (DIFFCO, Inggris) selama satu malam pada suhu 37°C sambil digoyang kurang lebih 100 rpm. Sebanyak 1 ml biakan tersebut ditambahkan ke dalam 10 ml medium yang sama dan diinkubasikan selama 1 jam, kemudian ditambahkan mitomycin C (200 ng/ml) dan inkubasi dilanjutkan selama 4 jam. Kultur di sentrifuge dengan kecepatan 10.000 x g selama 5 menit pada suhu 4°C. Filtrat yang diperoleh di saring menggunakan filter 0,45 um dan disimpan pada suhu 5°C untuk digunakan lebih lanjut. Masing-masing

bakteri patogen sebagai indikator atau tantang ditumbuhkan dalam medium kaldu Brain Hart Infusion (BHI), diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 malam. Sebanyak 0,5 ml suspensi biakan tersebut pada konsentrasi sekitar 10⁷ cfu (Mc. Farland nomor 0,5) dicampurkan kedalam 5 ml medium padat lunak LBM (47°C). Selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri yang berisikan 5 ml medium padat LBM dan didiamkan pada suhu 5°C selama 1 jam. Kemudian 10 µl filtrat yang akan diuji diteteskan di atas medium padat lunak tersebut dan didiamkan pada suhu 4°C selama 1 jam. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Zona jernih yang terjadi di sekitar tetesan diamati dan diukur diameternya.

Perlakuan yang sama seperti tersebut diatas dilakukan pula pada semua isolat bakteri Gram positif yang akan diuji. Hanya disini bedanya adalah medium yang dipakai kaldu *De Man Rogosa Shape* (MRS) dan tidak menggunakan *starter* maupun penambahan mitomycin C dan inkubasi selama 18-24 jam. Medium padat dan lunak yang dipakai adalah BHI.

Identifikasi BPB

Identifikasi BPB menggunakan metode standar menurut (Quinn et al. 2002; Barrow dan Feltham 2003) dan dimodifikasi dengan menggunakan medium spesifik untuk masing-masing bakteri. Masing-masing isolat yang berpotensi memproduksi bakteriosin hasil dari penapisan tersebut diatas dalam keadaan murni umur 24 jam diwarnai dengan pewarnaan Gram dan dilakukan pemeriksaan morfologi secara mikroskopik. Kemudian uji biokimia dilakukan dengan API 20 E (BIOMEREUX, Perancis), sedangkan kelompok bakteri Gram positif dengan API 50 CHL (BIOMEREUX, Perancis), BBL Crystal ANR dan BBL Crystal GP (Becton Dickinson, Amerika).

Konservasi eks situ BPB

Konservasi eks situ BPB dengan metode kering-beku (*freeze-drying*) sesuai dengan metode Rudge (1991) dan dimodifikasi. Panenan biakan murni dari mediumnya masing-masing disuspensikan ke dalam medium preservan 5% kaldu inositol, 5% serum inositol dan 10% susu skim untuk masing-masing kelompok enterobakteri, non enterobakteri dan bakteri asam laktat. Sebanyak 0,2 ml campuran suspensi tersebut dalam ampul steril siap untuk diproses kering-beku menggunakan mesin EDWARD *centrifugal freeze dryer*. Viabilitas BPB pra dan pasca proses kering-beku, serta pasca konservasi selama 1 tahun dalam suhu 5°C dalam *colony forming unit* (CFU) ditentukan dengan menuangkan suspensi tersebut ke dalam mediumnya masing-masing, lalu diinkubasi selama 37 atau 48°C

kondisi aerob atau semianaerob sesuai sifat masing-masing BPB.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Explorasi dan identifikasi bakteri BPB

Sebanyak 73 isolat dari kelompok bakteri Gram negatif dan 379 isolat dari kelompok bakteri Gram positif telah diisolasi dari 452 isolat bakteri hasil eksplorasi dari beberapa habitat dan host (Tabel 1). Dari dua kelompok bakteri tersebut telah dilakukan penapisan terhadap BPB dengan menggunakan 8 macam indikator bakteri patogen dan pembusuk pangan, diperoleh masing-masing 11 isolat dan 40 isolat (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil eksplorasi bakteri penghasil bakteriosin (BPB) dari berbagai sampel pada ternak sapi, kambing dan ayam

Asal sampel	Bakteri penghasil bakteriosin/bakteri yang ditapis (jumlah)	
	Gram positif	Gram negatif
Sapi:		
Swab rektal		11/73
Susu	15/78	
Cairan rumen	3/52	
Kambing:		
Susu	14/114	
Ayam:		
Isi usus	8/135	
Jumlah	40/379	11/73
	51/452	

Keragaman dalam genus dan spesies dari 51 isolat BPB teridentifikasi dipaparkan didalam Tabel 2. Diperoleh 2 genus (*Enterobacter* dan *Escherichia*) yang terdiri dari 2 spesies dari kelompok bakteri Gram negatif dan 9 genus (*Aerococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*) yang terdiri dari 21 spesies dari kelompok bakteri Gram positif. Hampir semua BPB yang diperoleh dalam kelompok bakteri Gram positif adalah bakteri asam laktat (BAL).

Aktivitas antibakteri BPB terhadap bakteri patogen dan pembusuk pangan

Aktivitas antibakteri dari 51 isolat BPB terhadap 8 macam indikator bakteri patogen dan pembusuk pangan dipaparkan di dalam Tabel 3.

Tabel 2. Keragam dalam genus dan spesies dari 51 isolat bakteri penghasil bakteriosin (BPB) teridentifikasi

Asal isolat	Spesies bakteri produsen bakteriosin teridentifikasi (jumlah isolat)	
	Gram negatif	Gram positif
Sapi:		
Swab rektal	<i>Escherichia coli</i> (9)	-
	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	
Susu	-	<i>Aerococcus viridans</i> (1)
		<i>Bifidobacterium dentium</i> (2)
		<i>Enterococcus faecium</i> (1)
		<i>Lactobacillus brevis</i> (1)
		<i>L. casei</i> (4)
		<i>L. plantarum</i> (1)
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1)
		<i>Streptococcus cristatus</i> (1)
		<i>S. mutan</i> (1)
		<i>S. sanguinis</i> (1)
		<i>S. uberis</i> (1)
Cairan rumen		<i>S. uberis</i> (1)
		<i>S. vestibularis</i> (2)
Kambing:		
Susu		<i>Aerococcus urinae</i> (2)
		<i>E. duran</i> (3)
		<i>E. faecalis</i> (1)
		<i>E. hirae</i> (1)
		<i>L. casei</i> (2)
		<i>L. lactis ssp cremoris</i> (1)
		<i>Pediococcus</i> sp. (1)
		<i>S. sanguinis</i> (3)
Ayam:		
Isi usus		<i>A. viridans</i> (3)
		<i>Bacillus cereus</i> (1)
		<i>B. mecentericus</i> (1)
		<i>E. avium</i> (1)
		<i>S. sanguinis</i> (2)

Bakteri *S. typhimurium* dan *S. enteritidis* yang bersifat patogenik pada ternak terutama ternak unggas yang berpotensi sebagai *foodborne disease* pada manusia (Flowers 2004) dan merupakan kontaminan utama pada daging sapi dan unggas segar (Ho et al. 2004). Sebanyak 7 dan 16 isolat BPB terkarakter

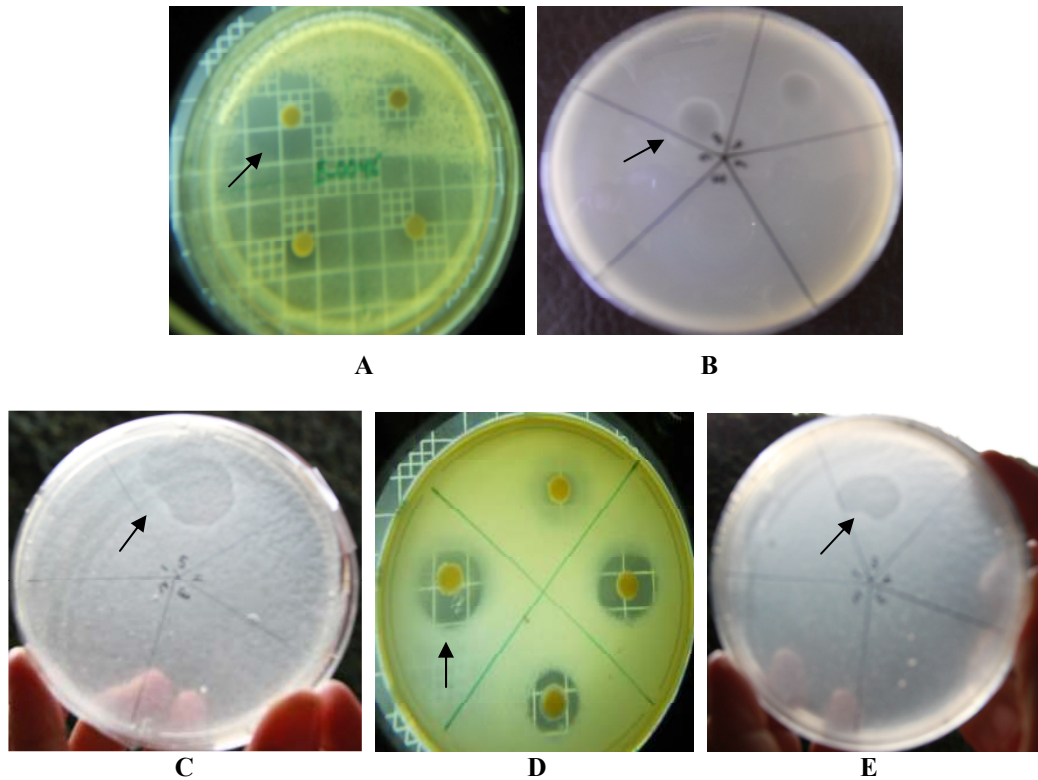
memiliki aktivitas antibakteri terhadap isolat *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311 dan *S. enteritidis* BCC B2459 dengan diameter zona hambat tertinggi masing-masing sebesar 26 mm dibentuk oleh *L. casei* SS14C (Gambar 1A), dan 12 mm oleh *E. faecium* S11A (Gambar 1B).

Tabel 3. Aktifitas antibakteri dari 23 spesies bakteri penghasil bakteriosin terhadap 8 indikator isolat bakteri patogen dan pembusuk pangan

Bakteri penghasil bakteriosin (species)	Diameter zona terhadap bakteri indikator:							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A. urinae</i>	0	11	0	-	0	15	0	-
	0	0	0	0	0	0	0	15
<i>A. viridans</i>	0	10	0	0	0	0	0	-
	10	0	0	12	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	12	0	0	0	0
<i>B. cereus</i>	0	0	0	0	0	7	15	-
<i>B. mesentericus</i>	0	0	0	0	0	0	15	-
<i>B. dentium</i>	15	10	7	15	0	14	0	-
	10	9	11	20	8	17	0	-
<i>E. cloacae</i>	0	0	24	0	15	0	0	-
	0	0	0	0	15	0	0	-
<i>E. avium</i>	0	7	10	-	0	0	0	-
<i>E. duran</i>	0	0	0	-	0	12	0	-
	0	0	12	-	0	0	0	-
	0	0	11	-	0	0	0	-
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	15	0	0	21
<i>E. faecium</i>	0	12	0	0	0	0	0	-
<i>E. hirae</i>	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>E. coli</i>	0	0	0	-	8	0	0	-
	0	0	0	-	8	0	0	-
	0	0	0	-	8	0	0	-
	0	0	0	-	8	0	0	-
	0	0	8	-	0	0	0	-
	0	0	8	-	0	0	0	-
	0	0	0	-	8	0	0	-
	0	0	0	-	8	0	0	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0	0	0	0	11	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	7	0	10	7	0	7	0	-
	26	0	0	10	0	17	0	-
	0	0	10	-	0	0	0	-
	0	10	0	-	0	0	0	-
	0	0	0	0	0	10	0	0
	0	0	0	0	0	8	0	0
<i>L. plantarum</i>	0	0	0	0	0	0	15	0
<i>L. lactis spp. Cremoris</i>	0	10	0	-	0	13	0	0
<i>L. mesenteroides</i>	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>Pediococcus sp</i>	0	0	0	0	0	8	0	0
<i>S. cristatus</i>	0	10	0	-	0	0	0	-
<i>S. mutan</i>	0	10	0	0	0	0	13	-
<i>S. sanguinis</i>	0	10	0	-	0	0	0	-
	0	10	0	-	0	10	0	-
	0	10	0	-	0	15	0	-
	0	8	0	-	0	12	0	-
	0	7	10	-	0	0	0	-
	0	0	10	-	0	0	0	-
<i>S. uberis</i>	11	11	11	11	11	0	11	-
	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>S. vestibularis</i>	0	0	0	7	0	10	0	14
	0	0	0	0	0	10	0	10

Bakteri indikator: 1. *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311
 2. *S. enteritidis* BCC B2459
 3. *E. coli* O₁₅₇ hemolitik BCC B2717
 4. *E. coli* O₁₅₇ VTEC non hemolitik BCC B2687

5. *E. coli* K₉₉ enterotoksigenik BCC B2422
 6. *B. cereus* BCC B2118/IMVS 2675
 7. *S. aureus* BCC B2062/ATCC 25923
 8. *L. monocytogenes* BCC B2767/ATCC 7764



A = *L. casei* SS14C terhadap *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311
B = *E. faecium* SS11A terhadap *S. enteritidis* BCC B1459
C = *E. cloacae* SRUT terhadap *E. coli* O₁₅₇ hemolitik BCC B2717
D = *B. dentium* SS14T terhadap *E. coli* VTEC O₁₅₇ BCC B2687
E = *E. faecalis* SK39 terhadap *E. coli* K 99 enterotoksigenik BCC B2422 ()

Gambar 1. Zona hambat yang dibentuk oleh mikroba penghasil bakteriosin

E. coli merupakan mikroflora normal pada saluran pencernaan hewan berdarah panas, unggas, dan manusia (Ray dan Bhunia 2007). Walaupun demikian, sebagian strain yang bersifat patogenik ditemukan. Salah satu kelompok *E. coli* patogenik yang dapat menimbulkan penyakit pada saluran pencernaan diantaranya *E. coli* enterotoksigenik (ETEC) menyebabkan diare pada anak babi, sapi dan kambing dan *E. coli* verotoksigenik (VTEC) menyebabkan hemoragik enterokolitis pada anak sapi, diare pada anak babi baru disapih dan hemoragik kolitis dan hemolitik uremik sindroma pada manusia (Quinn et al. 2002). Sementara itu, *E. coli* enterohemoragik (EHEC) O157: H7 menjadi perhatian utama dalam kesehatan masyarakat karena sering terjadi wabah yang sebagian besar disebabkan oleh bahan pangan asal sapi, air minum dan makanan yang terkontaminasi oleh kotoran sapi (Rangel et al. 2005). Beberapa studi epidemiologi telah menunjukkan bahwa bakteri patogen tersebut didistribusikan secara luas pada sapi, dan sapi ditetapkan sebagai *reservoir* alami,

bahkan menurut Husein (2007) kolonisasi patogen tersebut dalam rumen sulit dikendalikan oleh antibiotik.

Sebanyak 13 isolat BPB dalam studi ini bersifat bakterisidal terhadap *E. coli* O₁₅₇ hemolitik BCC B2717, 8 isolat bakterisidal untuk *E. coli* VTEC O₁₅₇ BCC B2687, dan 12 isolat bakterisidal terhadap *E. coli* ETEC K₉₉ enterotoksigenik BCC B2422 dengan diameter zona hambat tertinggi masing-masing berurutan sebesar 24 mm dibentuk oleh *E. cloacae* SRUT (Gambar 1C), 20 mm dibentuk oleh *B. dentium* SS14T (Gambar 1D), dan 15 mm dibentuk oleh *E. cloacae* SRUT (Gambar 1 E), *E. cloacae* SRNU dan *E. faecalis* SK39.

B. cereus pembentuk spora tahan terhadap: panas, kering dan asam lambung (Clavel et al. 2004) yang secara alami dapat terjadi di berbagai macam bahan pangan (Dadhich et al. 2006) dan dapat menghasilkan toksin sehingga menyebabkan penyakit (*foodborne illness*) atau keracunan (*food poisoning*) pada manusia. Gejala keracunan berbentuk muntah-muntah atau *emetic*

type of foodborne illness (Ehling-Schulz et al. 2004) yang dapat terjadi apabila manusia mengkonsumsi makanan yang mengandung *B. cereus* yang memproduksi *emetic toxin*. Sedangkan gejala diare akan terjadi apa bila manusia mengkonsumsi makanan yang mengandung *B. cereus* kemudian didalam usus toksin lain (*diarrhoeal toxin*) diproduksi. Dalam studi ini diperoleh 18 isolat BPB bersifat bakterisidal terhadap *B.cereus* BCC B2118 /IMVS 2675 produksi spora dengan diameter zona hambat terbesar adalah 17 mm dibentuk oleh *B. dentatum* SS14T (Gambar 2A) dan *L. casei* SS14C (Gambar 2 A).

S. aureus merupakan bakteri *food poisoning* (Le Loir et al. 2003) penyebab keracunan makanan akibat mengkonsumsi makanan yang mengandung enterotoksin yang dihasilkannya. Toksin tersebut bersifat tahan dalam suhu tinggi, meskipun bakteri mati dengan pemanasan namun toksin yang dihasilkan tidak akan rusak dan masih dapat bertahan meskipun dengan pendinginan ataupun pembekuan (Larkin et al. 2009). Bakteri tersebut merupakan bakteri yang selalu ada di mana-mana, seperti udara, debu, air buangan, air, susu, makanan dan peralatan makan, lingkungan, tubuh manusia dan hewan seperti kulit, rambut/bulu dan saluran pernafasan (Fueyo et al. 2005). Sebanyak 5 isolat BPB terkarakter memiliki aktivitas antibakteri terhadap isolat *S. aureus* BCC B2062/ATCC 25923 dengan diameter zona hambat terbesar adalah 15 mm dibentuk oleh *B. cereus* IUA03, *B. mesentericus* IUA12 dan *L. plantarum* SS78 (Gambar 2 B).

L. monocytogenes merupakan bakteri psikrotropik patogen terdapat pada daging unggas dan sapi serta olahannya (Mataragas 2003; Ho et al. 2004), umumnya ditemukan di rumah pemotongan ternak dan industri pengolahannya (Deumier dan Collignan 2003), dapat bertahan pada pH dan suhu rendah, sehingga berbahaya untuk produk beku. Masalah yang dihadapi akibat infeksi *L. monocytogenes* yaitu 63% bakteriemia dan 26% bermasalah dengan sistem syaraf (Veclerc et al.

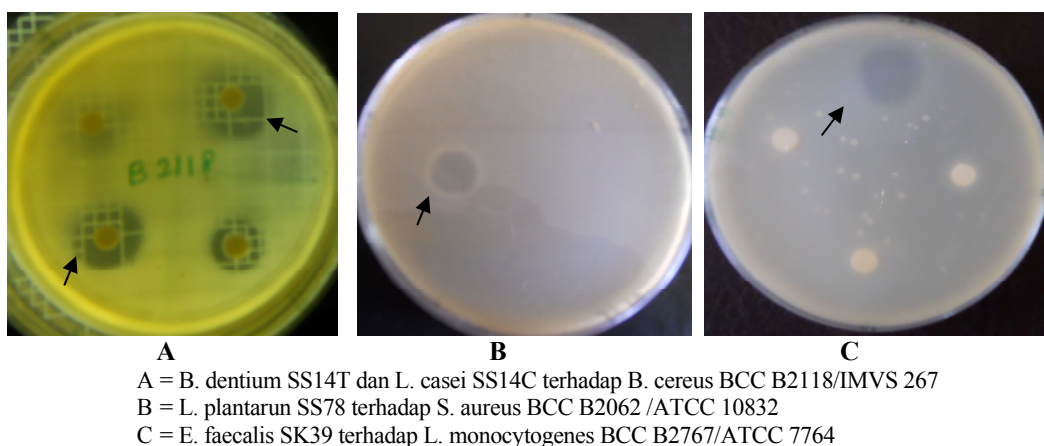
2002). Studi *invitro* diperoleh 6 isolat BPB yang bersifat bakterisidal terhadap isolat *L. monocytogenes* BCC B2767/ATCC 7764 dengan zona hambat terbesar adalah 21 mm dibentuk oleh *E. faecalis* SK39 (Gambar 2 C).

Spesifisitas target dari bakteriosin atau BPB merupakan keuntungan tersendiri dalam penggunaannya untuk pengendalian bakteri patogen pada saluran pencernaan ternak yang dapat menimbulkan penyakit pada ternak itu sendiri maupun *foodborne disease* tanpa mempengaruhi keseimbangan bakteri lain yang menguntungkan. Dari penelitian ini BPB yang potensial untuk pencegahan penyakit ternak maupun *food borne disease* adalah *E. cloacae* SRUT dan SRNU, *E. duran* K82 dan K85, *E. faecalis* K39, *E. faecium* S11, *A. viridan* S28B, A24 dan A28 (Tabel 3) karena memiliki target patogen tertentu.

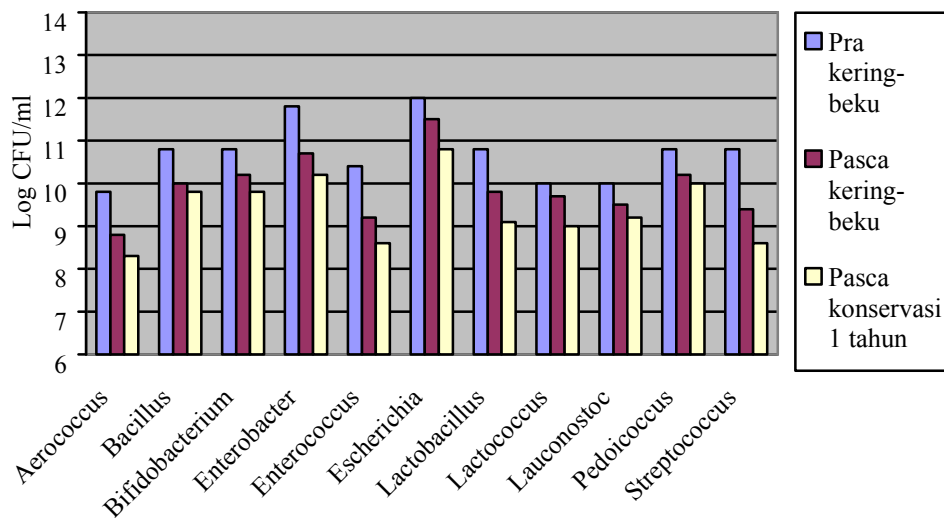
Bakteriosin atau BPB yang memiliki spektrum luas artinya dapat menghambat bakteri spesies lain, bahkan kelompok Gram yang berbeda, umumnya dihasilkan oleh BAL. Ini sangat menguntungkan untuk diterapkan pada industri makanan terutama makanan hasil fermentasi, dikarenakan aktivitasnya yang mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri kontaminan penyebab pembusukan makanan dan *foodborne disease* (Abdelbasset dan Djamilia 2008). Pada studi ini BPB yang memiliki spektrum luas adalah *B. dentium* SS14T dan SS15T, *L. casei* SS16O dan *S. uberis* S2 (Tabel3).

Konservasi eks situ BPB

Metode kering beku (*freeze-drying*) atau liofilisasi sudah dipergunakan puluhan tahun yang lalu untuk melestarikan berbagai macam materi biologi termasuk bakteri. Pada studi ini telah dilakukan konservasi eks situ BPB menggunakan metode tersebut. Pada Gambar 3 viabilitas BPB pra dan pasca proses kering-beku, serta 1 tahun pasca konservasi eks situ pada suhu 5°C dipaparkan. Penurunan viabilitas terlihat dari semua



Gambar 2. Zona hambat yang dibentuk oleh mikroba penghasil bakteriosin



Gambar 3. Viabilitas bakteri penghasil bakteriosin (BPB) pra dan pasca konservasi 1 tahun

PBB pasca proses kering beku mulai dari terendah log 0,3 (*Lactococcus*) sampai dengan tertinggi log 1,4 (*Streptococcus*) dan pasca konservasi 1 tahun pada suhu 5°C mulai dari terendah log 0,8 (*Lactococcus* dan *Leuconostoc*) sampai dengan tertinggi log 2.2 (*Streptococcus*).

KESIMPULAN

Sebanyak 51 isolat bakteri penghasil bakteriosin (BPB) yang terdiri dari 11 genus dan 23 spesies telah berhasil ditapis dari 452 isolat bakteri hasil eksplorasi dari beberapa habitat dan host. Masing-masing indikator bakteri patogen dan pembusuk pangan dihambat pertumbuhannya oleh lebih dari 5 macam BPB dengan diameter zona hambat tertinggi dibentuk oleh *L. casei* SS14C (26 mm); *E. faecium* SS11A (12 mm); *E. cloacae* SRUT (24 mm); *B. dentium* SS14T (20 mm); *E. faecalis* SK39 (15 mm); *Bifidobacterium dentium* SS14T (17 mm) dan *L. casei* SS14C (17 mm); *B. cereus* IUA03 (15 mm), *B. mesentericus* IUA12 (15 mm), *L. plantarum* SS78 (15 mm); dan *E. faecalis* SK39 (21 mm) terhadap masing-masing berurutan *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311, *S. enteritidis* BCC B1459, *E. coli* O₁₅₇ hemolitik BCC B2717, *E. coli* VTEC O₁₅₇ BCC B2687, *E. coli* K 99 enterotoksigenik BCC B2422, *B. cereus* BCC B2118/IMVS 2675, *S. aureus* BCC B2062 /ATCC 10832, dan *L. monocytogenes* BCC B2767/ATCC 7764. Konservasi eks situ pada suhu 5°C dalam ampul freeze-drying kondisi kering hampa udara telah dilakukan terhadap semua isolat BPB untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara luas dalam aplikasi penggunaan bakteriosin atau PBP pada ternak di lapangan untuk mencegah penyakit tertentu dan *foodborne disease*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis sampaikan ucapan terima kasih kepada Sdr. Agus Wahyudin dan Sdr. Sukatma teknisi litkayasa di kelompok peneliti Bakteriologi yang telah membantu dalam persiapan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelbasset M, Djamila K. 2008. Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb" African J Biotechnol. 7:2908-2914.
- Barrow GI, Feltham RKA. 2003. Cowan and Steel'S. Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press, UK. pp: 118-119.
- Braden CR. 2006. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. Clin Infect Dis. 43:512-517.
- Callaway TR, Anderson RC, EdringtonTS, Genovese KJ, Harvey RB, Poole TL, Nisbet DJ. 2004. Recent pre-harvest supplementation strategies to reduce carriage and shedding of zoonotic enteric bacterial pathogens in food animals. Anim Health Res Rev. 5:35-47.
- Cheigh CL, Pyun YR. 2005. Nisin biosynthesis and its properties. Biotechnol. Lett. 27:1641-1648.

- Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C, Schmitt P. 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol.* 97:214-219.
- Dadhich SK, Somani LL, Verma A. 2006. Improved soybean yield, nutrient uptake and P enrichment in soil due to co-inoculation of phosphate solubilizing bacteria and VAM fungi in a clay loam soil. *Ind J Microbiol.* 46:405-407.
- Deumier F, Collignan A. 2003. The effects of sodium lactate and starter cultures on pH, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. levels in pure chicken dry fermented sausage. *Meat Sci.* 65:1165-1174.
- Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of foodborne illness. *Molecular Nutrition and Food Res.* 48:479-487.
- Flowers RS. 2004. *Salmonella*. In: *Bacteria Associated with Foodborne Diseases*. Institute of Food Technologists (Ed). Washington. USA. pp. 3-6.
- Fueyo JM, Mendoza MC, Martín MC. 2005. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: Epidemiological and genetic findings. *Microbes Infect.* 7:187-194.
- Gillor O, Kirkup BC, Riley MA. 2004. Colicins and Microcins: The next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* 54:129-146.
- Herreros MA, Sandoval H, González L, Castro JM, Fresno JM, Tornadizo ME. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.* 22:455-459.
- Ho CP, Huang NY, Chen BJ. 2004. A survey of microbial contamination of food contact surfaces at broiler slaughter plants in Taiwan. *J Food Prot.* 67:2809-2811.
- Hussein HS. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their product. *J Anim Sci.* 85:63-72.
- Ko SH, Ahn C. 2000. Bacteriocin production by *Lueconostoc lactis* KCA2386 isolated from White Kimchi. *Food Sci Biotechnol.* 9:263-269.
- Kumar P, Ferzin S, Chintan S, Kumar GN. 2009. Isolation and characterization of potential probiotic *Escherichia coli* strains from rat faecal samples. *Am J Infect Dis.* 5:112-117.
- Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. 2009. *Staphylococcus aureus*: The toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Curr Med Chem.* 16:4003-4019.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2:63-76.
- Mataragas M, Drosinos EH, Metaxopoulos J. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. *Food Microbiol.* 20:259-265.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Werdlow DL. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 11:603-609.
- Ray B, Bhunia AK. 2007. *Fundamental food microbiology*. 4th ed. Boca Raton FL (USA). CRC Press.
- Revolledo L, Ferreira AJP, Mead GC. 2006. Prospects in *Salmonella* control: Competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *J Appl Poult Res.* 15:341-351.
- Rudge RH. 1991. Maintenance of bacteria by freeze-drying. In: Kirsop BE, Doyle A, editors. *Maintenance of microorganisms and cultured cells a manual of laboratory methods*. 2nd ed. London (UK): Academic Press. p. 31-38.
- Schamberger GP, Phillips RL, Jacobs JL, Diez-Gonzalez F. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Appl Environ Microbiol.* 70:6053-6060.
- Shand RF, Leyva KJ. 2008. Archaeal antimicrobials: An discovered country. In: Blum P, Editor. *Archaea: New models for prokaryotic biology*. Norfolk (UK): Caister Academic. p. 233-242.
- Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics: A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* 96: 219-233.
- Veclerc V, Dufour B, Lombard B, Gauchard F, Garin-Bastuji B, Salvat G, Brisabois A, Poumeyrol M, De Buyser ML, Gnanou-Besse N, Lahellec C. 2002. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livest Prod Sci.* 76:195-202.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002. *Veterinary microbiology and microbial disease: enterobacteriaceae*. Oxford (UK): Blackwell Press. p. 84-123.